



Genetic Study of Molecular Marker(s) Linked to Rhizoctonia Root Rot Resistance Genes in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.)

Mastaneh Sharifi¹ | AliReza Taleei² | Peyman Norouzi³ | MohammadReza Naghavi⁴ | MohammadMehdi Faghihi⁵

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran & Sugar Beet Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran. Email: sharifi.mastaneh@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: ataleei@ut.ac.ir
3. Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: p.norouzi@areeo.ac.ir
4. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: mnaghavi@ut.ac.ir
5. Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran. Email: m.faghihi@areeo.ac.ir

Article Info	Extended Abstract
Article type: Research Article	Introduction. Sugar beet is the main source of sugar with about 35% of the world's sugar production. It is affected by various pathogenic factors. The most important pathogens that lead to sugar beet root rot is the <i>Rhizoctonia solani</i> fungus, which exists in many areas of sugar beet cultivation. Given that conventional breeding methods for resistance to this disease are difficult and time-consuming, the development and identification of resistance-associated markers and the determination of the locus controlling resistance to this disease can significantly accelerate root rot resistance breeding programs and provide a new perspective for plant breeding advances. To achieve resistant cultivars, the development of markers related to resistance can help breeding programs. In this regard, the aim of this research is to identify molecular markers associated with rhizoctonia resistance genes to accelerate the screening of sugar beet breeding materials.
Article history: Received: January 05, 2025 Revised: March 12, 2025 Accepted: April 05, 2025	Materials and Methods. In this study, 20 pairs of primers were used to investigate 10 susceptible and 10 resistant plants from two F2 populations in order to identify molecular markers linked to the resistance gene to rhizoctonia root rot of sugar beet. The primers were examined in terms of band pattern and the bands were scored based on their presence or absence (zero and one). DNA extraction was performed using Modified Dellaporta <i>et al.</i> (1983) or Norouzi (2003), and PCR was used with a BIO RAD thermocycler. Cluster analysis and grouping of genotypes were performed using Jaccard similarity coefficient and UPGM method and principal component analysis (PCA) based on distance matrix using NTSYS: pc 2.1 software.
Keywords: genetic diversity, polymorphism, root rot disease, SSR, sugar beet.	Results and Discussion. In this experiment, SSR markers were able to identify 31 alleles with a range of one to four alleles in each gene location and reproduce 355 locations. The average amplified location for 20 primer pairs was 17.75 and the range of polymorphic information content change was 0.54 to 0.75 with an average of 0.66. The range of similarity coefficient obtained from SSR markers varied from 0.35 to 0.9. In breeding programs, the varieties that have the least similarity are the best plants for crossbreeding. The cophenetic correlation coefficient was obtained based on the Jaccard similarity coefficient of 0.76. Based on the cut line, a cluster diagram was created with six subgroups at a distance of 0.46. Also, the results of principal component analysis showed that the first five components explained about 59% of the total variation between lines. With the studies conducted, five markers (SSR: 4, 10, 23, 32, and 50) were able to distinguish between 15% - 40% of plants sensitive and resistant to rhizoctonia root rot.
	Conclusion. According to studies conducted on the genetic diversity of different sugar beet plants using SSR markers, some plants were not included in their similar group, despite having a resistant or susceptible phenotype to root rot disease. Based on the results of this study and the results of previous research, it can be concluded that the resistance or sensitivity of sugar beet plants can be influenced by one or more specific genes and the presence or absence of these genes, does not necessarily cause genetic similarity or dissimilarity of genotypes with each other. For the final confirmation and validation markers, more sensitive and resistant samples will be tested with the selected SSR and the best marker(s) will be introduced.

Cite this article: Sharifi, M., Taleei, A.R., Norouzi, P., Naghavi, M.R., & Faghihi, M.M. (2025). Genetic study of molecular marker(s) linked to rhizoctonia root rot resistance genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Iranian Journal of Field Crop Science*, 56(3), 111-125. DOI: 10.22059/ijfcs.2025.388142.655120.



مطالعه ژنتیکی نشانگر (های) مولکولی پیوسته به ژن های مقاومت به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه چغندر قند (*Beta vulgaris* L.)

مستانه شریفی^۱ | علیرضا طالعی^۲ | ایمان نوروزی^۳ | محمدرضا نقوی^۴ | محمدمهدی فقیهی^۵

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران و بخش تحقیقات چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. رایانامه: sharifi.mastaneh@ut.ac.ir
۲. نویسنده مسئول، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ataleci@ut.ac.ir
۳. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: p.norouzi@areeo.ac.ir
۴. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mnaghavi@ut.ac.ir
۵. بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. رایانامه: m.faghihi@areeo.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۶ کلیدواژه ها: ارقام مقاوم، بیماری پوسیدگی، تنوع ژنتیکی، چغندر قند، SSR.	چغندر قند از منابع اصلی قند و شکر با حدود ۳۵ درصد از تولید شکر جهان است. از مهمترین بیمارگرهایی که منجر به پوسیدگی ریشه چغندر قند می شود قارچ <i>Rhizoctonia solani</i> می باشد که در بسیاری از مناطق کشت چغندر قند شیوع دارد. برای دستیابی به ارقام مقاوم، یافتن نشانگرهای مرتبط با مقاومت می تواند به برنامه های اصلاحی کمک کند. در این پژوهش جهت شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن مقاومت به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه چغندر قند، ۲۰ جفت آغازگر برای بررسی ۱۰ بوته حساس و ۱۰ بوته مقاوم از دو جمعیت F₂ استفاده شد. این آغازگرها از نظر الگوی نواری مورد بررسی قرار گرفتند و نوارها بر اساس عدم وجود یا وجود (صفر و یک) یادداشت شدند. تجزیه خوشه ای و گروه بندی ژنوتیپ ها بر اساس داده های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و تجزیه به مولفه های اصلی (PCOA) بر اساس ماتریس فاصله با استفاده از نرم افزار NTSYS:pc 2.1 انجام شد. در این آزمایش نشانگرهای SSR توانستند ۳۱ آلل را با دامنه یک تا چهار آلل در هر مکان ژنی شناسایی و ۳۵۵ مکان را تکثیر نمایند. میانگین مکان تکثیر شده برای ۲۰ جفت آغازگر ۱۷/۷۵ و دامنه تغییر محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۵۴ تا ۰/۷۵ با میانگین ۰/۶۶ به دست آمد. پنج نشانگر SSR (۴، ۱۰، ۲۳، ۳۲ و ۵۰) بین ۱۵ تا ۴۰ درصد گیاهان حساس و مقاوم به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه را متمایز کردند. برای تایید و اعتبارسنجی نشانگرها، تعداد بیشتری از نمونه های حساس و مقاوم با SSRهای انتخاب شده آزمایش و در نهایت برترین نشانگر (ها) معرفی خواهند شد.

استناد: شریفی، م.، طالعی، ع.، نوروزی، پ.، نقوی، م.ر.، و فقیهی، م.م. (۱۴۰۴). مطالعه ژنتیکی نشانگر (های) مولکولی پیوسته به ژن های مقاومت به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه چغندر قند (*Beta vulgaris* L.). *علوم گیاهان زراعی ایران*، ۵۶(۳)، ۱۱۱-۱۲۵. DOI: 10.22059/ijfcs.2025.388142.655120



۱. مقدمه

چغندر قند یکی از دو محصول مهم تأمین‌کننده قند در جهان و تنها محصول ذخیره‌کننده ساکارز در نواحی مدیترانه است که سطح کشت جهانی آن بالغ بر ۵/۴ میلیون هکتار با عملکرد ۲۸۱ میلیون تن ریشه و سطح کشت آن در ایران حدود ۹۰ هزار هکتار با عملکرد پنج میلیون تن ریشه در سال ۲۰۲۳ برآورد شده است (FAOSTAT, 2023). کشت چغندر قند که حدود ۳۵ درصد از تولید شکر جهان را به خود اختصاص می‌دهد، تحت تأثیر عوامل بیماری‌زای مختلف قرار دارد. یکی از مهمترین بیمارگرهایی که منجر به پوسیدگی ریشه چغندر قند می‌شود قارچ *Rhizoctonia solani* می‌باشد (Haque & Parvin, 2021). در ایران اکثر مناطق چغندرکاری تحت تأثیر این بیمارگر است (Soltani Nezhad, 2008). با شیوع این بیماری عملکرد، درصد قند و قابلیت سیلوپذیری ریشه‌های چغندر قند آلوده به شدت کاهش می‌یابد (Misra et al., 2023; Soltani Nezhad, 2008).

ریزوکتونیا از نظر تاکسونومیک، تنوع ژنتیکی، بیماری‌زایی و اکولوژیکی یک مجموعه بسیار متنوع می‌باشد (Wounde 2015; Mordue et al., 1989). این گونه عامل مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و طوقه و بلایت برگ‌ی چغندر قند بوده (Abawi et al., 1986; Pethybridge et al., 2018) و تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از جمعیت آن گزارش گردیده است؛ لذا به آن، گونه مرکب اطلاق شده است (Vilgalys & Cubeta, 1994).

بیماری ناشی از *R. solani* در مرحله بلوغ به صورت پوسیدگی ریشه و طوقه یا گاهی اوقات پوسیدگی حفره‌ای دیده می‌شود (Pethybridge et al., 2018; Windels et al., 2009). دامنه وسیع میزبانی این قارچ در کنار توانایی بالای آن در فعال بودن در خاک و مواد آلی، کنترل قارچ را دشوار می‌کند. پیشرفت‌های تحقیقات از نظر مدیریت این بیماری، شامل کاوش رویکردهای زیست فناوری و روش‌های جدید کنترل زیست‌شناسی می‌باشد. این راهبردهای نوآورانه، پتانسیل مدیریت پایدار بیماری، کاهش اتکا به قارچ‌کش‌های معمولی و به حداقل رساندن اثرات زیست‌محیطی را به دنبال دارد (Misra et al., 2023). مدیریت بیماری شامل تناوب زراعی با محصولات غیرمیزبان (Hecker & Ruppel, 1977; Pethybridge et al., 2018; Abawi et al., 1986)، مدیریت صحیح علفهای هرز (Harveson, 2003)، تیمار بذر، کاربرد قارچ‌کش در طول فصل (Pethybridge et al., 2018) و مدیریت زراعی (Schneider, 1982) در ترکیب با استفاده از گونه‌های مقاوم سازگار با مناطق تولید است. غربال‌گری مداوم خزانه ژنی، شناسایی منابع مقاومت و انتقال ژن‌های مقاومت از طریق برنامه‌های دورگ‌گیری به ارقام مناسب و قوی از موفق‌ترین روش‌ها برای کاهش پیامدهای منفی بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه در چغندر قند است (Panella, 1998; Gaskil, 1968). همچنین توالی کامل ژنوم *B. vulgaris* ابزار ارزشمندی برای تحقیقات ژنومیک چغندر قند ایجاد کرده است (Norouzi et al., 2024).

باتوجه به اینکه روشهای اصلاحی معمول برای مقاومت به این بیماری مشکل و زمان‌بر است، توسعه و شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت و تعیین مکان کنترل‌کننده مقاومت به این بیماری می‌تواند به‌طور قابل توجهی برنامه‌های اصلاحی مقاومت در برابر پوسیدگی ریشه را تسریع و چشم‌انداز جدیدی را برای پیشرفت‌های اصلاح گیاهان فراهم کند (MirMohammadi Maibody & Golkar, 2019, Mirsa 2023, Norouzi et al., 2024).

گرچه ژن‌های غالب نسبی (partial dominance)، (Hecker & Ruppel, 1977) و حتی تعدادی مکان ژنی کمی (QTL) (Lein et al., 2008) برای مقاومت به این بیماری شناسایی شده‌اند، ولی این صفت کمی است و مبتنی بر حداقل دو جایگاه ژنی به همراه سایر ژن‌های کم‌اثر و تغییردهنده می‌باشد و سهم QTL‌های کوچک و ژنومی را نمی‌توان رد کرد (Norouzi et al., 2024).

نظری (Nazari, 2011) از یک جمعیت F_2 چغندر قند حاصل تلاقی بین لاین مقاوم FC-709-2 و لاین حساس ۲۳۱، برای مکان‌یابی ژنتیکی با کمک نشانگرهای AFLP، ISSR و STS استفاده کردند. از بین ۷۵ نشانگر حاصل تنها یک نشانگر AFLP با کمترین فاصله به آل مقاومت و در حدود ۱۹/۲ سانتی‌مورگان شناسایی شد. حسنی و همکاران (Hassani et al., 2018) چهار توالی SNP مرتبط با مقاومت به ریزوکتونیای چغندر قند شناسایی کردند که در مجموع ۴۳ درصد تنوع فنوتیپی مقاومت را پوشش می‌داد. راوی و همکاران (Ravi et al., 2022) با غربال هزاران توالی SNP موفق شدند یک نشانگر SNP برای ژن مقاومت به

ریزوکتونیا در چغندر قند به دست آورند که حدود ۱۰ درصد تنوع فنوتیپی صفت را پوشش می‌داد. همچنین محققان در شرکت تولید بذر KWS آلمان در پژوهشی روی نشانگرهای پیوسته با مقاومت به این بیماری در گلخانه، تعداد پنج QTL (۲-۳ ژن اصلی و تعداد زیادی ژن تغییر دهنده) شناسایی کردند (Rajabi & Aghaezadeh, 2013).

یکی از بهترین و سریع‌ترین نشانگرهای مولکولی در بررسی چندشکلی، نشانگر SSR یا ریزماهواره می‌باشد. نشانگرهای SSR در ژنوم تمام یوکاریوت‌ها وجود دارد (Li *et al.*, 2010). SSRها به دلیل فراوانی زیادشان برای مکان‌یابی ژنتیکی و مطالعه جمعیت، نشانگرهای ایده‌آلی هستند و استفاده از آنها بسیار ساده و راحت می‌باشد (Naghavi *et al.*, 2005).

در بین تمام تکنیک‌های مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل داشتن خصوصیات همچون وراثت همباز، فراوانی و تکرارپذیری بالا، چندشکلی زیاد، قابلیت انتقال به گونه‌های خویشاوند، توزیع در نواحی مختلف ژنوم (در هر دو نواحی رمز کننده coding و غیر رمز کننده non coding)، ماهیت چنداللی و پوشش وسیع ژنوم به‌طور گسترده‌ای به منظور بررسی تنوع ژنتیکی استفاده می‌شوند (Hag *et al.*, 2014). همچنین سهولت آشکارسازی و تشخیص آنها به‌وسیله کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دو آغازگر اختصاصی که از برخی نواحی مجاور ریزماهواره (Flanking region) طراحی می‌شود از دیگر مزایای آنهاست (Sharma *et al.*, 2014).

در روش معمول از ارزیابی فنوتیپی مقاومت در گلخانه یا میکروپلات استفاده می‌شود. گزینش فنوتیپی اغلب در معرض اثر متقابل ژنوتیپ و محیط است؛ علاوه بر آن گزینش برخی صفات پرهزینه، زمان‌بر، غیرقابل اعتماد و گاهی مستلزم انتظار طولانی برای ظهور صفت است. افزایش کارایی گزینش و تسریع برنامه‌های اصلاحی همواره یکی از موضوعات مهم اصلاح‌نباتات بوده است. در همین راستا هدف از این تحقیق شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های مقاومت به ریزوکتونیا جهت تسریع در غربال‌گری مواد اصلاحی چغندر قند می‌باشد.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ژنوتیپ والدین چغندر قند حساس و مقاوم به ریزوکتونیا و دو جمعیت F₂ (F₂-A و F₂-B) حاصل از آنها بود که در سال‌های قبل در گلخانه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند تهیه و نمونه برگ از والدین دو جمعیت آنها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده آتی نگهداری شده بود.

۲-۲. آماده‌سازی مایه تلقیح

جهت تهیه مایه قارچ، ابتدا بذور چغندر قند به مدت ۲۴ ساعت داخل آب خیس‌خورده و پس از ریختن داخل ظروف شیشه‌ای، دو بار به فاصله ۲۴ ساعت ضدعفونی شدند. سپس قطعاتی از جدایه‌های مورد نظر (AG 2-2,133) رشدیافته روی محیط کشت PDA (Potato Dextros Agar) با کد 1.10130.0500 و به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. ارلن‌ها به‌صورت مرتب و روزانه تکان داده شدند تا دانه‌های چغندر قند به قارچ آلوده شوند (Mahmoudi *et al.*, 2004).

۲-۳. ارزیابی گلخانه‌ای

از بذور دو جمعیت F₂ (والدین دو جمعیت F₂ به‌کاررفته در این تحقیق شامل اوتایپ حساس به ریزوکتونیا (FC-201-33076) و گرده‌افشان مقاوم به ریزوکتونیا (8627-S1) بوده است) از هر کدام ۲۵۰ گلدان (در مجموع ۵۰۰ گلدان) در گلخانه همراه با بوته‌های شاهد حساس و مقاوم به ریزوکتونیا کشت شد. ابتدا در هر گلدان پنج عدد بذر چغندر قند کاشته شد و تا زمان مایه‌زنی تعداد بوته باقی‌مانده در هر گلدان به یک عدد رسید. بعد از رسیدن گیاهان به سن هشت هفتگی در هر گلدان شش عدد دانه چغندر قند آغشته به قارچ *R. solani* در عمق سه سانتیمتری در نزدیکی ریشه قرار داده شد. جدایه مورد استفاده در این تحقیق از گروه آناستوموزی AG 2-2,133 بود (Mahmoudi *et al.*, 2004). چهار هفته پس از تلقیح، ارزیابی ناشی از فعالیت قارچ به‌صورت نمره‌دهی به بوته هر یک از گلدان‌ها با روش مقیاس یک تا نه باتنر و همکاران (Buttner *et al.*, 2004) انجام شد. در این روش نمره یک گیاهان دارای ریشه‌های سالم (فاقد زخم و لکه روی ریشه)، نمره دو حدود یک درصد، نمره سه بین یک تا پنج درصد،

نمره چهار بین پنج تا ۱۰ درصد، نمره پنج بین ۱۰ تا ۲۵ درصد، نمره شش بین ۲۵ تا ۵۰ درصد، نمره هفت بین ۵۰ تا ۷۵ درصد، نمره هشت بیش از ۷۵ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر ناشی از ریزوکتونیا می‌باشند. در نمره نه گیاه از بین رفته و ریشه کاملاً پوسیده می‌باشد. برای نمونه برداری اولیه گیاهی، ابتدا ۱۰ بوته حساس و ۱۰ بوته مقاوم با توجه به نمره بیماری انتخاب و استخراج DNA از برگ‌های مربوط صورت گرفت (جدول ۱).

۲-۴. استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی، از ۵۰-۱۰۰ گرم بافت برگ‌های فریز شده نمونه‌های حساس و مقاوم به بیماری ریزوکتونیا با استفاده از روش دلاپورتای تغییر یافته (Modified Dellaporta *et al.*, 1983) و یا روش نوروزی (Norouzi, 2003) صورت گرفت. برای ارزیابی کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده از الکتروفورز ژل یک درصد و دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر استفاده شد. نمونه‌های DNA پس از تعیین غلظت، به غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند و نمونه‌هایی که کیفیت استخراج بالایی داشتند مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۵. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از نشانگرهای SSR چغندر قند

تکثیر DNA ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با دستگاه ترموسایکلر BIO RAD انجام شد. برای ایجاد بهترین شرایط PCR، توسط آزمون گرادیان، غلظت‌های مناسب نمک، آغازگر و DNA تعیین شد. حجم کلی هر واکنش PCR، ۱۴ میکرولیتر بود که شامل شش میکرولیتر مخلوط آماده (مسترمیکس) PCR (امپلیکون، دانمارک)، پنج میکرولیتر آب مقطر ضد عفونی شده، یک میکرولیتر از هر یک از نشانگرهای SSR و یک میکرولیتر از DNA ژنومی بود (اسامی ۲۵ جفت آغازگر و توالی آنها در جدول ۲ آورده شده است).

برنامه PCR شامل واسرشت کردن ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه تکثیر شامل مرحله واسرشت کردن ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۰ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و تکثیر DNA در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و بعد از آن تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد (لازم به ذکر است که دمای مرحله اتصال آغازگر برای هر نشانگر با توجه به توالی آن در نظر گرفته شد).

برای مشاهده چندشکلی حاصل از نشانگرهای SSR در هر جایگاه ژنی و تفاوت نوارها در جدایه‌ها، هفت میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز دو تا ۲/۵ درصد (حاوی سه میکرولیتر رنگ Safe Stain در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE) به مدت سه ساعت در ولتاژ ۱۰۰ برده شد. تصویر ژل با اشعه UV و توسط دستگاه ژل‌داک (Gel Logic QUANTUM ST4, Germany) عکس‌برداری شد. برای تعیین اندازه قطعات از نشانگر با نوارهای استاندارد (شرکت سیناکلون، cat.NO.SL7041) استفاده شد.

۲-۶. تجزیه آماری

محصولات تکثیر شده حاصل از نشانگرهای ریزوماهواره، براساس وجود نوار (۱) و عدم وجود نوار (۰) برای هر جفت آغازگر اختصاصی به منظور تشکیل ماتریس دوتایی کدگذاری شد. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی از ضریب تشابه جاکارد در مقایسه با دایس و تشابه مقابل ساده و روش UPGMA در مقایسه با UPGMC و روش دورترین همسایه استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCOA) بر اساس ماتریس فاصله با استفاده از نرم‌افزار NTSYS:pc 2.1 انجام شد (Rohlf, 2000).

در این مطالعه نسبت چندشکلی نشانگرها با استفاده از فرمول $p = \frac{n_{pj}}{n_{total}}$ و شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی PIC با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ (Prasad *et al.*, 2000). در این فرمول P_i و p_j فراوانی آلل‌های i و j در یک مکان مشخص ریزوماهواره می‌باشد. باتوجه به ضریب همبستگی کوفتیک در نهایت تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انتخاب و انجام شد. سپس پراکنش ژنوتیپ‌ها با استفاده از نمودار دوبعدی و سه‌بعدی حاصل از پنج مولفه اصلی اول برای تایید یا عدم تایید گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بررسی شد. همچنین جهت تفکیک و گروه‌بندی جمعیت، مکان خط‌برش با استفاده از روش جذرگیری و میانگین ماتریس تشابه جاکارد روی محور فاصله مشخص شد.

جدول ۱. مشخصات بوته‌های حساس و مقاوم چغندر قند مورد مطالعه.

Table 1. Characteristics of the susceptible and resistant sugar beet plants under study.

ردیف	بوته	وضعیت	کد بوته
۱	گرده‌افشان HM1990	حساس (شدت آلودگی ۱ تا ۷)	S1
۲	F2 (FC-201*HM1990)		S2
۳	F2 (FC-201*HM1990)		S3
۴	F2 (FC-201*HM1990)		S4
۵	F2 (FC-201*HM1990)		S5
۶	F2 (FC-201*HM1990)		S6
۷	F2(OT-940150*OT-940184)		S7
۸	F2(OT-940156*OT-940184)		S8
۹	OT-FC-201-9		S9
۱۰	OT-FC-201-9		S10
۱۱	گرده‌افشان FC-201	مقاوم (شدت آلودگی ۱ تا ۳)	R1
۱۲	F2 (FC-201*HM1990)		R2
۱۳	F2 (FC-201*HM1990)		R3
۱۴	F2 (FC-201*HM1990)		R4
۱۵	F2 (FC-201*HM1990)		R5
۱۶	F2 (FC-201*HM1990)		R6
۱۷	F2 (FC-201*HM1990)		R7
۱۸	F2 (FC-201*HM1990)		R8
۱۹	F1(OT-940206*OT-940184)		R9
۲۰	OT-FC-201-9		R10

۳. یافته‌های پژوهشی و بحث

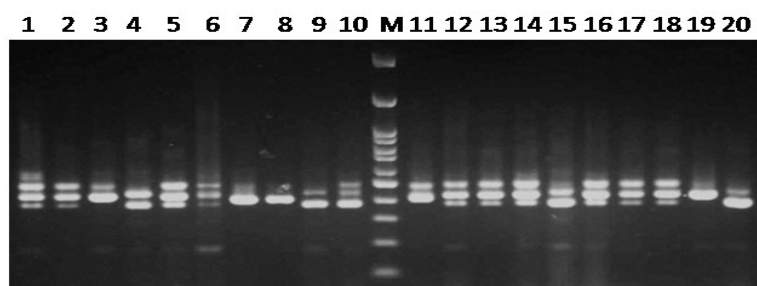
با استفاده از نرم‌افزار primer3 و oligo analyzer و با استفاده از سایت NCBI تعداد ۳۲۰۰ نشانگر SSR طراحی و شناسایی شد. با استفاده از genome data viewer در سایت NCBI جهت تثبیت و اطمینان از حضور توالی‌های شناسایی‌شده در نه کروموزوم چغندر قند، ۶۲ جفت آغازگر SSR تایید و سفارش داده شدند. با بررسی‌های اولیه این آغازگرها روی نمونه‌های والد حساس و مقاوم به ریزوکتونیا، از قبل تعدادی آغازگر SSR معرفی شده بود (Norouzi *et al.*, 2024) که از آنها برای آزمون در تک‌بوته‌های جمعیت‌ها استفاده شد (جدول ۲).

تنوع ژنتیکی بوته‌های مورد مطالعه (جدول ۱) با استفاده از ۲۵ آغازگر SSR (جدول ۲) مورد بررسی قرار گرفت. پنج آغازگر نتوانستند نوار واضحی ایجاد کنند و حذف شدند. شش جفت آغازگر SSR45, SSR9, SSR10, SSR20, SSR23, SSR32 و SSR50 نوارهای چندشکل را در بوته‌های مورد بررسی نشان دادند (شکل ۱ و ۲). در کل آغازگرهای SSR توانستند ۳۱ نوار تولید کنند که از این تعداد پنج نوار تک‌شکل و بقیه نوارها چندشکل بودند. میانگین تعداد نوار برای هر آغازگر در ۲۰ بوته برابر ۱/۳ بود. همچنین نشانگرهای SSR، ۳۵۵ مکان را تکثیر کردند که میانگین مکان تکثیر شده برای ۲۰ آغازگر ۱۷/۷۵ بود. آغازگرهای ۹ و ۴۵ با سه نوار و آغازگر ۲۳ با چهار نوار بیشترین چندشکلی را نشان دادند. بیشترین مکان تکثیر شده مربوط به بوته‌های مقاوم به ریزوکتونیا بود.

جدول ۲. فهرست و مشخصات جفت ۲۵ آغازگر SSR.

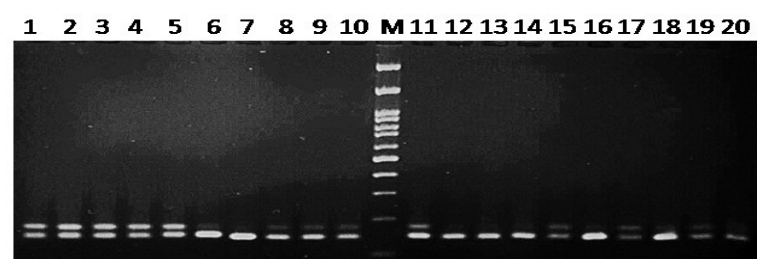
Table 2. List and characteristics of 25 SSR primer pairs.

ردیف	آغازگر	فوروارد ۵'-۳'	ریورس ۳'-۵'	دمای اتصال (سلسیوس)	جایگاه کروموزومی آغازگر
۱	SSR-1	TATTGTTCTAAGGCACGCA	CGCTATCCTCTTCGTCAA	۵۲	۱
۲	SSR-2	TGAGGAGAGAGAAAGTGAAGA	ACCATCAAGCCAATCAGTAA	۵۸	۲
۳	SSR-4	AGACTGAAGATAGAGCAAGGG	AGAAGTAGAAGGCAACTCCAC	۵۸	۴
۴	SSR-9	ACATCAACAACAACAACAACA	GAGAGAACAGAGTCCAAAGGT	۵۴	۶
۵	SSR-10	GCGCTATCAAGATTCCACTGCAGCAGAC	CAACTGATTTTACTAGCTCACCAC	۶۲	۶
۶	SSR-11	ACGAGGAACAAATCCACACC	CAACACCAGTCGATGTTTG	۵۸	۸
۷	SSR-13	GGTTTGCACCTTTCTTAGATGG	GAGCCAATCAATCTTCAGCC	۶۰	۷
۸	SSR-14	ATCAAACCTCCTCTGTCTC	TTACAACAACAACAACAAA	۵۶	۶
۹	SSR-16	TGGCAAGTGTATGTGTCTTT	AAGTTCAGTTCAGATTAGTTCAG	۵۶	۴
۱۰	SSR-19	ATAACTCTCGCCTACAAATGA	TCTACCTTGCCCGTAAACT	۶۰	۲
۱۱	SSR-20	GGTGGTTATGCTCCTCCT	GGCTTTAGTCTTATTGCTGTG	۶۰	۵
۱۲	SSR-21	ATCTTCTTGACTTGGCTCTC	ACTGTGAGCAATCATCTACC	۵۸	۵
۱۳	SSR-23	CTCATCCTTCTCTCTTTCC	CTCACATTGCGTCCCTTT	۵۶	۱
۱۴	SSR-25	GCAGAAGGTTGAAGAAGAA	AGTCTCAGGATGATGCCC	۵۴	۱
۱۵	SSR-29	CTGTGCTTTCAGACCAAATC	GGAGAGAGAGAATGAGTAAGG	۵۴	۳
۱۶	SSR-31	AGATTGTATTATTGTTGTTGGAG	AAGGTTAGGGTTTAGGGTATT	۵۲	۳
۱۷	SSR-32	AGACTGAAGATAGAGCAAGGG	AGAAGTAGAAGGCAACTCCAC	۵۴	۴
۱۸	SSR-34	TGTGGATGCGCTTTCTTTTC	ACTCCACCCATCCACATCAT	۵۴	۴
۱۹	SSR-43	AACCCTAACCTAACCTAAC	CACCAATAACCAAGAAACAA	۵۲	۶
۲۰	SSR-45	TACGAGTTCCAAGAATGGTG	TCAAGAAGCAGAAGAATGAGA	۵۲	۷
۲۱	SSR-50	AACAGCAACAAGAGATGGTAG	TGACTTATCAAACAACCCTGA	۵۲	۷
۲۲	SSR-52	GACGAATCAAACCTCCT	TGTCGCCTGAGAAATGAA	۵۶	۷
۲۳	SSR-55	ATACCAACATCAGCGTCAA	GGTGAAACGAAAGGAAACC	۵۲	۸
۲۴	SSR-56	ATCAGCGTCAACCACAAC	AACGGTAAAGAATCAACCATC	۵۲	۸
۲۵	SSR-58	AGAGGGAGCATCAAAGAATAG	TTCAAGGAACCAAGTAAAGAAA	۵۰	۹



شکل ۱. الگوی نواری آغازگر SSR23 در ۲۰ نمونه چغندر قند (۱۰-۱ حساس و ۱۱-۲۰ مقاوم به پوسیدگی ریشه) روی ژل آگارز ۲/۵ درصد، M: نشانگر وزن مولکولی 3kbp.

Figure 1. Banding pattern of the SSR23 primer in 20 sugar beet samples (1-10 susceptible and 11-20 resistant to root rot) on a 2.5% agarose gel. M: 3 kbp molecular weight marker.



شکل ۲. الگوی نواری آغازگر SSR50 در ۲۰ نمونه چغندر قند (۱۰-۱ حساس و ۱۱-۲۰ مقاوم به پوسیدگی ریشه) روی ژل آگارز ۲/۵ درصد، M: نشانگر وزن مولکولی 3kbp.

Figure 2. Banding pattern of the SSR50 primer in 20 sugar beet samples (1-10 susceptible and 11-20 resistant to root rot) on a 2.5% agarose gel. M: 3 kbp molecular weight marker.

آماره ژنتیکی محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) معیاری معمول برای نشان دادن کارایی یک مکان ژنی یا سیستم نشانگر است. میانگین این آماره در کل بوته‌های مورد بررسی ۰/۶۶ بود. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به مکان ژنی SSR2 و SSR9 به مقدار ۰/۷۵ و کمترین آن به غیر از مکان‌های ژنی که نوارهای تک‌شکل داشتند (مقدار ۰) مربوط به SSR45 به مقدار ۰/۵۴ بود. دامنه تغییر محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۵۴ تا ۰/۷۵ با میانگین PIC برای کل جفت آغازگرها ۰/۶۶ به‌دست آمد (جدول ۳). عسکری‌نژاد و همکاران (Askarinejad *et al.*, 2016) شناسایی هفت نشانگر SSR با ۵۸ آلل و دامنه چهار تا ۱۱ آلل با متوسط هفت نوار چندشکل به ازای هر جفت آغازگر و میانگین چندشکلی ۰/۷۶ برای کل آغازگرها را بیان داشتند. در هر مکان ژنی هرچند محتوای اطلاعات چندشکلی به عنوان یکی از ویژگی‌های مهم نشانگرهای مولکولی در نظر گرفته می‌شود و می‌تواند برای ارزیابی تمایز نشانگرها از هم به‌کار رود (Junjian *et al.*, 2002)، اما در مورد بررسی و ارتباط با بیماری ریزوکتونیا در چغندر قند بعضی از آغازگرها مانند SSR 4 که تک‌نوار بود توانست با تشکیل نوار فقط در بوته‌های حساس (۱۵ درصد) برای ادامه کارهای مولکولی مورد توجه باشد. آغازگرهای ۲۳ و ۵۰ با ۲۵ درصد تشکیل نوار فقط در بوته‌های حساس و آغازگرهای ۱۰ و ۳۲ به‌ترتیب با ۴۰ درصد و ۲۰ درصد تشکیل نوار فقط در بوته‌های مقاوم نسبت به بقیه آغازگرها، درصد تشخیص و جداسازی مناسبی داشتند (جدول ۴).

دامنه ضریب تشابه به‌دست‌آمده از نشانگر SSR در این تحقیق از ۰/۳۵ تا ۰/۹ متغیر بود (شکل ۳). در کارهای اصلاحی ارقامی که کمترین تشابه را با هم دارند، بهترین بوته‌ها برای کارهای اصلاحی در دورگ‌گیری هستند و برعکس ارقامی که بیشترین تشابه ژنتیکی را با هم دارند برای برنامه‌های اصلاحی چندان مناسب نیستند.

۳-۱. گروه‌بندی بوته‌های حساس و مقاوم براساس مشاهدات مولکولی

باتوجه‌به اینکه در مقایسه ضرایب همبستگی، مقدار ضریب همبستگی مربوط به روش جاکارد از دیگر روش‌ها بالاتر به‌دست آمد و همچنین انطباق بالاتری بین تفکیک بوته‌ها و اطلاعات موجود وجود داشت، گروه‌بندی بوته‌ها براساس فواصل ژنتیکی و

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA انجام گرفت. ضریب همبستگی کوفتیک براساس ضریب تشابه جاکارد ۰/۷۶، دایس ۰/۶۹ و ساده ۰/۷۳ مشاهده شد و با توجه به آزمون مانتل در سطح یک درصد معنی‌دار به دست آمد.

بر اساس خط‌برش، نمودار خوشه‌ای در فاصله ۰/۵۵ به ۱۰ زیرگروه مجزا تقسیم شد. قابل ذکر است اگر این گروه‌بندی در فاصله ۰/۴۶ صورت گیرد شش زیرگروه ایجاد خواهد شد.

جدول ۳. تعداد نوارها و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) جفت آغازگرهای SSR.

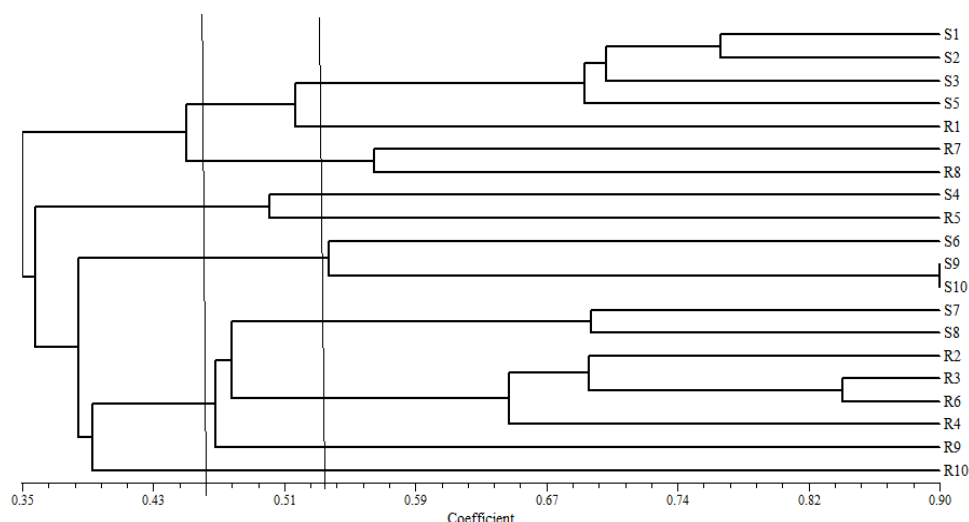
Table 3. Number of bands and polymorphism information content (PIC) of SSR primer pairs.

ردیف	جفت آغازگر	تعداد کل نوار تولید شده	تعداد نوار چندشکل	تعداد نوار تک شکل	محتوای اطلاعات چندشکلی	درصد تجمعی تشخیص بوته حساس از مقاوم (درصد)
۱	SSR-2	۱	۱	۰	۰/۷۵	۱۵
۲	SSR-4	۱	۱	۰	۰/۶۵	۱۵
۳	SSR-9	۳	۳	۰	۰/۷۵	۱۵
۴	SSR-10	۲	۱	۱	۰/۷۴	۴۰
۵	SSR-11	۱	۱	۰	۰/۷۴	۱۰
۶	SSR-13	۱	۱	۰	۰/۷۱	۰
۷	SSR-14	۱	۱	۰	۰/۷۱	۱۰
۸	SSR-19	۱	۱	۰	۰/۷۳	۲۵
۹	SSR-20	۲	۲	۰	۰/۷۳	۱۵
۱۰	SSR-21	۱	۱	۰	۰/۷۴	۱۰
۱۱	SSR-23	۴	۴	۰	۰/۷۱	۱۵
۱۲	SSR-32	۲	۲	۰	۰/۶۴	۲۰
۱۳	SSR-45	۳	۳	۰	۰/۵۴	۵
۱۴	SSR-50	۲	۲	۰	۰/۶۴	۲۵
۱۶	SSR-55	۱	۱	۰	۰/۷۱	۱۰
۱۷	SSR-56	۱	۱	۰	۰/۷۱	۱۰

جدول ۴. آغازگرهای موثر جهت ادامه کارهای اصلاحی براساس درصد تشکیل نوار در گروه حساس و مقاوم به پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی چغندر قند.

Table 4. Effective primers for further breeding programs based on the percentage of band formation in sugar beet groups susceptible and resistant to rhizoctonia root rot.

ردیف	آغازگر	اندازه نوار	درصد تشخیص	تعداد نوار در بوته حساس	تعداد نوار در بوته مقاوم
۱	SSR50	۱۵۰-۲۰۰	۲۵	۵	۰
۲	SSR4	۲۰۰-۲۵۰	۱۵	۳	۰
۳	SSR32	۲۰۰-۲۵۰	۲۰	۰	۴
۴	SSR10	۳۰۰-۳۵۰	۴۰	۰	۸
۵	SSR23	۳۸۰-۵۱۰	۲۵	۴	۱



شکل ۳. نمودار درختی حاصل از پلی مورفیسم ۲۰ بوته چغندر قند مقاوم (R) و حساس (S) به پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی با جفت آغازگرهای SSR. **Figure 3.** Dendrogram of polymorphism of 20 sugar beet plants resistant (R) and susceptible (S) to rhizoctonia root rot with SSR primer pairs.

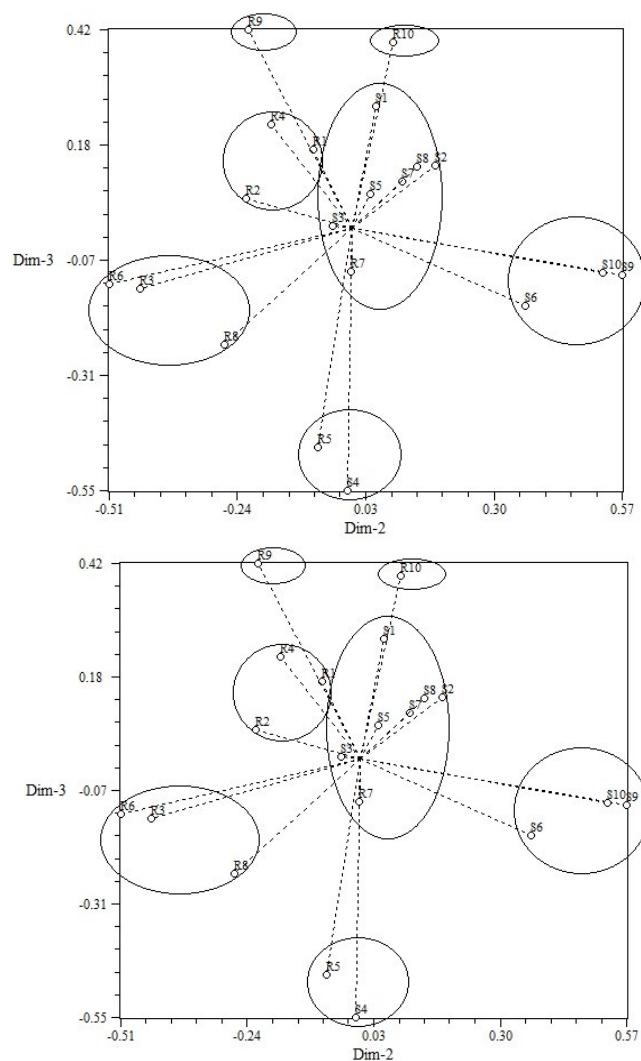
نتایج حاصل نشان داد که S1, S2, S3, S5 در یک گروه قرار گرفتند که در مجموع ۲۰ درصد بوته‌ها می‌باشند. در گروه دوم S7 و S8، گروه سوم R4, R2, R3, R6 و گروه چهارم R7 و R8 قرار گرفتند. بقیه بوته‌ها در این فاصله از بقیه مجزا شده و به صورت تکی قرار گرفتند. به عبارت دیگر از نظر نشانگرهای به کار رفته تنوع مشاهده شده میان بوته‌های حساس و مقاوم به نسبت مساوی و حدود ۶۰ درصد قابل مشاهده بود. ضریب تشابه نشان داد که بوته مقاوم R10 و بوته حساس S4 از نظر ژنتیکی فاصله زیادی با هم دارند.

به منظور تعیین نحوه پراکنش نشانگرهای SSR در چغندر قند، آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که پنج مؤلفه اول حدود ۵۹ درصد از تنوع کل بین لاین‌ها را تبیین کردند (جدول ۵). مؤلفه اول ۱۸/۴۶ درصد، مؤلفه دوم ۱۳/۲۲ درصد و مؤلفه سوم ۱۰/۵۵ درصد، مؤلفه چهارم ۸/۵۰ و مؤلفه پنجم ۷/۶۲ از تغییرات کل را تبیین کردند. با این درصدها توزیع نسبتاً مناسب نشانگر SSR مورد استفاده در سطح ژنوم مشاهده می‌شود، پراکنش ژنوتیپ‌ها در یک نمودار سه بعدی براساس پنج مؤلفه اصلی اول، تقریباً همانند گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توانست بوته‌ها را تفکیک کند (شکل ۵)، اما با گروه‌بندی دو بعدی تعدادی از بوته‌های حساس و مقاوم در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۴).

جدول ۵. مشخصات پنج مؤلفه اول بر اساس مشاهدات SSR.

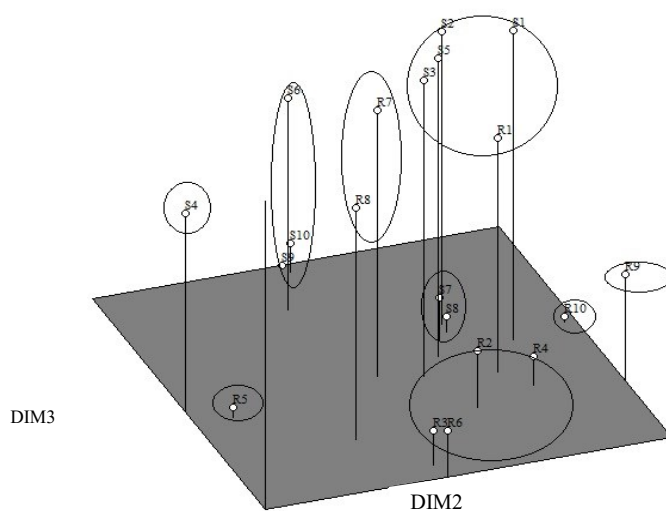
Table 5. Characteristics of the first five components based on SSR observations.

مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه	واریانس جزء	واریانس تجمعی
۱	۲/۱۱	۱۸/۷۶	۱۸/۷۶
۲	۱/۴۸	۱۳/۲۲	۳۱/۹۸
۳	۱/۱۸	۱۰/۵۵	۴۲/۵۴
۴	۰/۹۵	۸/۵۰	۵۱/۰۴
۵	۰/۸۵	۷/۶۲	۵۸/۶۶



شکل ۴. گروه‌بندی دو بعدی بوته‌های مقاوم (R) و حساس (S) به پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی چغندر قند به وسیله پنج مؤلفه اول حاصل از مشاهدات نشانگر SSR.

Figure 4. Two dimensional grouping of resistant (R) and susceptible (S) plants to rhizoctonia root rot of sugar beet by the first five components obtained from SSR marker observations.



شکل ۵. گروه‌بندی سه بعدی بوته‌های مقاوم (R) و حساس (S) به پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی چغندر قند به وسیله پنج مؤلفه اول حاصل از مشاهدات نشانگر SSR.

Figure 5. Three dimensional grouping of resistant (R) and susceptible (S) plants to rhizoctonia root rot of sugar beet by the first five components obtained from SSR marker observations.

شایان ذکر است که کمبود درصد تبیین تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چندمتغیره مانند تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌تواند ناشی از توزیع مناسب نشانگرهای مولکولی در سراسر ژنوم و در نتیجه عدم کفایت سه مؤلفه اول برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی باشد. به همین خاطر از پنج مؤلفه اول برای رسم نمودار و گروه‌بندی بوته‌ها استفاده شد. از طرفی توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به مفهوم ارزیابی دقیق‌تر و بهتر مولکولی به دلیل نمونه‌برداری مناسب از کل ژنوم است (Fazli & HaghMyrza, 2012).

در اکثر مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی به وسیله نشانگرهای مولکولی، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها نیز صورت می‌گیرد. هدف اصلی در اینجا انتخاب آغازگرهای مناسب برای ادامه کارهای اصلاحی در تفکیک ارقام مقاوم و حساس به بیماری ریزوکتونیای می‌باشد. در این راستا بوته‌هایی انتخاب شدند که حداکثر فاصله ژنتیکی از هم داشته باشند و آغازگری معرفی شود که بتواند در ادامه کارهای اصلاحی چغندرقد تفکیک مناسبی بین ارقام حساس و مقاوم ایجاد کند و همچنین در مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی بتواند گروه‌بندی مناسبی بین ارقام و بوته‌ها نشان دهد. از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های چغندرقد بر اساس مشاهدات نشانگرهای مختلفی از جمله RAPD، ISSR در چند مطالعه استفاده شده است (Qiaohong *et al.*, 2012; Srivastara *et al.*, 2007; Sen & Alikamanoglu, 2012). در مطالعه‌ای برای مکان‌یابی ژن‌های مقاومت به پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی نشان داده شد که سه QTL روی کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۷ مجموعاً ۷۱ درصد تنوع فنوتیپی این صفت را پوشش می‌دهند (Lein *et al.*, 2008).

چغندرقد گیاهی زراعی است که مناطق کشت آن تا حد زیادی قابل انعطاف است با این وجود کشت آن در عرض‌های جغرافیایی جنوبی مناطق معتدله توسط عوامل بیماری‌زا تهدید می‌شود (Norouzi *et al.*, 2017). پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه چغندرقد که توسط قارچ *R. solani* ایجاد می‌شود هم‌چنان به صورت یک مشکل در بسیاری از مناطق کشت چغندرقد در ایران و در سرتاسر جهان وجود دارد. ریشه چغندرقد دارای پوسیدگی ریزوکتونیایی فراوان، در صورت عدم حذف پیش از انبارکردن، می‌تواند به ۵۰ درصد کاهش در عملکرد (Herr, 1996)، فساد در توده ریشه‌های انباشته‌شده و کاهش خلوص شربت منجر شود. پوسیدگی ریزوکتونیایی را می‌توان تا حدی از طریق روش‌های زراعی، تناوب زراعی و اقدامات شیمیایی کنترل نمود (Stump *et al.*, 2004). با این حال، تنها با بکارگیری استراتژی‌های فوق نمی‌توان به کنترل کامل دست یافت؛ بنابراین، دستیابی به ارقام مقاوم یک امر مهم برای مدیریت مؤثر پوسیدگی ریزوکتونیایی می‌باشد (Norouzi *et al.*, 2017).

نشانگر ریزوماهواره می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر و مقرون‌به‌صرفه پتانسیل برای کاوش تنوع ژنتیکی مولکولی در چغندرقد برای دستیابی به ترکیبات جدید ژنتیکی استفاده شود (Srivastava *et al.*, 2017). ریزوماهواره‌ها یکی از کارآمدترین نشانگرهای مولکولی از نظر توزیع مناسب در ژنوم، سهولت استفاده، و هم‌باز بودن و طبیعت چندالل می‌باشند (Srivastava *et al.*, 2017; Bogachiva *et al.*, 2019). نشانگرهای DNA، مانند نشانگرهای ریزوماهواره (SSR)، به طور گسترده‌ای برای ارزیابی تنوع ژنوتیپی مواد اصلاحی استفاده می‌شوند. تجزیه و تحلیل SSR به یک اصلاحگر اجازه می‌دهد تا چندشکلی تکرارهای DNA پشت سرهم را آشکار کند (Khemleben *et al.*, 2003; Bogachiva *et al.*, 2019). نشانگرهای SSR و SNP توارث هم‌باز دارند و برای برآورد ساختار و روابط خویشاوندی افراد قابلیت بهتری دارند. علاوه بر آن نشانگرهای SSR عموماً از لحاظ گزینشی خنثی هستند (Ataee *et al.*, 2017).

باتوجه به آنکه روش‌های ارزیابی کلاسیک و گزینش برای مقاومت به بیماری از نوع فنوتیپی بوده و به شرایط محیطی و یکنواختی عامل آلوده‌کننده وابسته هستند و در فصل خاصی از سال انجام می‌گیرند و نیز بعضی گیاهان از عامل آلوده‌کننده به نحوی می‌گریزند و به ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این رو با استفاده از روش‌های مولکولی، به عنوان روش تکمیلی و یا جایگزین می‌توان گیاهان دربردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود، بنابراین نشانگرهای مولکولی DNA می‌توانند ابزاری مفید برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم باشند و باعث صرفه‌جویی در زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب گردند (Norouzi *et al.*, 1390).

در این مطالعه نشانگرهای SSR توانستند ۳۱ آلل با دامنه ۱ تا ۴ آلل در هر مکان ژنی را شناسایی کنند که متوسط تعداد نوار چندشکل به ازای هر جفت آغازگر ۰/۳ نوار بود. در این تحقیق محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر جفت آغازگر SSR

نیز محاسبه شد. بیشترین PIC مربوط به جفت آغازگرهای SSR2 و SSR9 با ۰/۷۵ و کمترین PIC مربوط به جفت آغازگر SSR45 با مقدار ۰/۵۴ بود. میانگین PIC برای کل جفت آغازگرها حدود ۰/۶۶ به دست آمد. عباسی و همکاران (Abbasi et al., 2014) در مطالعه خود روی تنوع ژنتیکی ۱۶۸ ژنوتیپ چغندرقد با استفاده از ۱۸ نشانگر SSR گزارش کردند که دامنه تعداد آلل به ازای هر جفت آغازگر ۱۰۴۰ و متوسط آن ۷/۵ آلل بود. همچنین دامنه PIC از ۰/۳۶ تا ۰/۸۳ متغیر و میانگین ۰/۶۴ بود. در بررسی دیگری از تنوع ژنتیکی ۱۲۹ ژنوتیپ چغندرقد با ۳۳ نشانگر SSR، متوسط تعداد آلل به ازای هر جفت آغازگر ۳/۰۵ آلل و دامنه PIC از ۰/۱۳۰ تا ۰/۶۰۲ متغیر و میانگین ۰/۴۶۲ بود (Peng et al., 2024). هر چه عدد متوسط تعداد قطعه چندشکل و محتوای اطلاعات چندشکلی به ازای هر جفت آغازگر بیشتر باشد کارایی آن نشانگر در گیاه مورد مطالعه بالاتر است و نمایانگر قدرت تمایز بیشتر نشانگر می‌باشد. زیاد نبودن تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر مکان ژنی در این مطالعه می‌تواند بیانگر فاصله زیاد تنوع بیماری بین بوته‌های مورد استفاده شده باشد؛ چرا که از بوته‌هایی که درصد بالای پوسیدگی را نشان دادند و با نمرات ۸ و ۹ مشخص شدند و آنهایی که نمرات ۱ و ۲ و بدون علائم بودند استفاده شد. برای اعتبارسنجی نشانگرها باید از محدوده بوته‌هایی که حدوسط مقاومت هم هستند استفاده شود تا تنوع آلی بیشتر مشاهده گردد؛ اما میانگین PIC بالا (۰/۶۶) در این مطالعه، بیانگر قدرت تمایز مناسب نشانگرهای SSR استفاده شده در این مطالعه است. باتوجه به اینکه جفت آغازگرهای SSR2 و SSR9 دارای بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۷۵) بودند، بنابراین می‌توان آنها را به عنوان جفت آغازگرهای مفید و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چغندرقد مقاوم و حساس به پوسیدگی ریشه معرفی و جهت اعتبارسنجی (Validation) نمونه‌های بیشتر انتخاب و برای شروع کارهای اصلاحی پیشنهاد شود. همچنین از نظر درصد تشخیص با توجه به نوارهای ایجاد شده در بوته‌های حساس و مقاوم، SSRهای ۴، ۱۰، ۲۳، ۳۲ و ۵۰ جهت اعتبارسنجی در ژنوتیپ‌های بیشتر برای ادامه این تحقیق معرفی می‌شوند. از طرفی بر اساس آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی پنج مولفه اول ۵۸/۶۶ درصد از کل تغییرات را بین ۲۰ بوته چغندرقد توجیه نمودند. هر چند گروه‌بندی مناسبی بین بوته‌ها صورت گرفت؛ ولی باتوجه به نتایج به دست آمده از دندروگرام دو بعدی بوته‌ها، می‌توان استنباط کرد که تنوع ژنتیکی ایجاد شده می‌تواند رابطه مستقیمی با مقاوم یا حساس بودن بوته‌ها نداشته باشد. در واقع باتوجه به بررسی‌های انجام شده در خصوص وجود تنوع ژنتیکی بوته‌های مختلف چغندرقد با نشانگر SSR مشخص شد بعضی از بوته‌ها با وجود داشتن مقاومت یا حساسیت به بیماری پوسیدگی ریشه با فاصله از هم گروه خود در یک گروه تک قرار گرفته و همبستگی قابل توجهی را نشان ندادند و در چند حالت بوته حساس و مقاوم در یک گروه قرار گرفتند. می‌توان استنباط کرد که مقاوم یا حساس بودن گیاه چغندرقد می‌تواند تحت تأثیر یک و یا چند ژن خاص باشد که لزوماً وجود یا عدم وجود این ژن‌ها باعث تشابه ژنتیکی و یا عدم تشابه ژنوتیپ‌ها با یکدیگر نمی‌شود.

۴. نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای SSR به خوبی در سطح ژنوم پراکنده شده‌اند و کارایی مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چغندرقد مقاوم و حساس به پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی دارند. برای تایید و اعتبارسنجی نشانگرها، تعداد بیشتری از نمونه‌های حساس و مقاوم با SSRهای انتخاب شده آزمایش و در نهایت برترین نشانگر(ها) معرفی خواهند شد.

۵. سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد در تامین امکانات جهت انجام این پژوهش کمال تشکر را دارد.

۵. منابع

Abawi, G.S., Crosier, D.C., Cobb, A.C., & Becker, R.F. (1986). Root rot of table beets in New York State. *New York's Food and Life Sciences Bulletin*, 115.

- Abbasi, Z., Arzani, A., Majidi, M.M., Sadeghian, S.Y., Rajabi, A., Hooshmand, S., Talebi, M., & Mirmohammadi Meibodi, S.M. (2014). Genetic study of salt tolerance and assessment of genetic variation using molecular markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). PhD Thesis. Isfahan University of Technology, 165pp. (In Persian).
- Askarinejad, P., Vatandoost, J., & Nasr, M. (2016). Assessment of genetic diversity among resistant and susceptible sugar beet genotypes to cyst nematode using SSR molecular markers. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 3(29), 302-311. (In Persian).
- Ataei, R., Mohammadi, V., Talei, A.R., & Naghavi, M.R. (2016). Association mapping of yield and some important agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Modern Genetics Journal*, 11(3), 411-423. (In Persian).
- Bogachiva, N.N., Fedulova, T.P., & Nalbandyana, A.A. (2019). Innovation methods in molecular breeding of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Russian Agricultural Sciences*, 45(3), 247-250.
- Buttner, G., Pfahler, B., & Marlander, B. (2004). Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to rhizoctonia root and crown rot. *Plant Breed. Z. Für Pflanzenzucht*, 123, 158-166.
- Fazli, P., & HaghMyrza, K. (2011). Study of genetic diversity in native chickpea mass with markers ISSR. *Modern Genetics*, 6, 104-97.
- Gaskill, J.O. (1968). Breeding for rhizoctonia resistance in sugarbeet. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists*, 15, 107-119.
- Haq, S., Jain, R., Sharma, M., Kachhwaha, S., & Kothari, S.L. (2014). Identification and characterization of microsatellites in expressed sequence tags and their cross transferability in different plants. *International Journal of Genomics*, 1-12.
- Haque, M., & Parvin, M. (2021). Sugar beet, its disease *Rhizoctonia* root rot, and potential biological agents. *Agricultural and Biological Research*; 37(1), 96-101.
- Harveson, R.M., Stack, J.P., Watkins, J.E., Giesler, L.J., & Chacky, J.L. (2003). Sugar beet disease profiles I. *Univ. of Nebr. Coop. Ext. Circ*; EC03-1885-S.
- Hassani, M., Heidari, B., Stevanato, P., Campagna, G., Broccanello, C., Norouzi, P., Concheri, G., & Panella, L. (2018). A candidate single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to resistance to infection with rhizoctonia in sugar beet. *76th IIRB Congress, 5-7 June. Normandy, France*.
- Hecker, R.J., & Ruppel, E.G. (1977). Rhizoctonia root-rot resistance in sugar beet: Breeding and related research. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists*, 19, 246-256.
- Herr, L.J. (1996). Sugar beet diseases incited by *Rhizoctonia* spp. In rhizoctonia species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control, eds. Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., and Dijst, G. 341-349. (Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
- Holmquist, L., Dlfors, F., Fogelqvist, J., Cohn, J., Kraft, T., & Dixelius, C. (2021). Major latex protein-like encoding genes contribute to *Rhizoctonia solani* defense responses in sugar beet. *Molecular Genetics Genomics*, 296, 155-164.
- Junjian, Ni., Colowit, P.M., & Mackill, D.J. (2002). Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. *Plant Genetic Resource*, 42(2), 601-607.
- Khemleben, V., Beridze, T.G., Bakhman, L., Kovarik, Y., & Torres, R. (2003). Satellite DNAs, *Usp. Biol. Khim*, 43, 267-306.
- Lein, J., Sagstetter, C., Scheuermann, D., Thureau, T., Varrelmann, M., Saal, B., Koch, G., Borchardt, D., & Jung, C. (2008). Mapping of rhizoctonia root rot resistance genes in sugar beet using pathogen response-related sequences as molecular markers. *Plant Breeding*, 127, 602-611.
- Li, Y., Chen, L., Lin, F., & Hassain, K. (2010). Identification of SSR markers linked to resistance against the spotted stem borer in sorghum. *Middle-East Journal of Scientific Search*, 6(5), 505-521.
- Mahmoudi, S.B., Mesbah, M., & Alizadeh, A. (2004). Pathogenic variability of sugar beet isolates of *Rhizoctonia solani*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 40(3-4), 253-280. (In Persian).
- Mir Mohammadi Maibody, S.A.M., & Golkar, P. (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, 6, 1. (In Persian).
- Misra, V., Mall, A.K., & Singh, D. (2023). Rhizoctonia root-rot diseases in sugar beet: Pathogen diversity, pathogenesis and cutting-edge advancements in management research. *Journal of the Microbe*, 1, 100011.
- Mordue, J.E., Curran, R.S., & Bridge, P.D. (1989). An integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: Cultural, biochemical and numerical techniques. *Mycological Research*, 92, 78-910.
- Naghavi, M.R., Ghareyazi, B., & Hosseini Salekdeh, G. (2005). Molecular markers. *Publication of Tehran University*, 23(2), 21-40. (In Persian).
- Nazari, A. (2018). Identification of molecular markers connected with genes controlling resistance to *Rhizoctonia* in sugar beet. Master's thesis. Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding. *Aburihan Campus. University of Tehran*. (In Persian).

- Norouzi, P. (2003). The simple and effective method for genomic DNA extraction from plant and fungus for PCR-based analyses. *Journal of Sugar Beet*, 19(2), 175-177. (In Persian).
- Norouzi, P., Mahmoudi, S.B., Aghaizadeh, M., Kakoinejad, M., Orazhizadeh, M.R., Vahedi, S., & Fathi, M.R. (2018). Reproducibility of some molecular markers linked to rhizomania resistance gene (*Rz1*) in sugar beet genotypes. *Journal of Crop Breeding*, 8, 30-42. (In Persian).
- Norouzi, P., Rajabi, A., Azizi, H., & Stevanato, P. (2024). Molecular breeding as the foundation for inducing resistance to biotic stresses in sugar beet. *Euphytica*, 220(125), 1-12.
- Norouzi, P., Stevanato, P., Mahmoudi, S.B., Fasahat, P., & Biancardi, E. (2017). Molecular progress in sugar beet breeding for resistance to biotic stresses in sub-arid conditions-current status and perspectives. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 2, 99-105.
- Panella, L. (1998). Screening and utilizing *Beta* genetic resources with resistance to *Rhizoctonia* root rot and *Cercospora* leaf spot in a sugar beet breeding program. *International Crop Network Series*, 12. *International Plant Genetic Resources Institute, Rome*, 62-72.
- Peng, F., Zhi, Pi., Shengnan, Li., & Zedong, Wu. (2024). Genetic diversity and population structure analysis of excellent sugar beet (*Beta vulgaris* L.) germplasm resources. *Horticulturae*, 10(2), 120.
- Pethybridge, S.J., Kikkert, J.R., Hanson, L.E., & Nelson, S.C. (2018). Challenges and prospects for building resilient disease management strategies and tactics for the New York table beet industry. *Agronomy*, 8(7), 112.
- Prasad, M., Varshney, R.K., Roy, J.K., Balyan, H.S., & Gupta, P.K. (2000). The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3-4), 584-592.
- Qiaohong, L., Dayou, C., Lin, Y., Chengfei, L., Fanjiang, K., & Yumei, W. (2012). Construction of digital fingerprinting and cluster analysis using ISSR markers for sugar beet cultivars. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*; 28, 280-284.
- Rajabi, A., & Aghaeizadeh, M. (2013). Report of participating in the training course of beet sugar beet in KWS Germany, June and July. (In Persian).
- Ravi, S., Hassani, M., Heidari, B., Deb, S., Orsini, E., Li, J., Richards, C., Panella, L., Srinivasan, S., Campagna, G., Concheri, G., Squartini, A., & Stevanato, P. (2022). Development of an SNP assay for marker-assisted selection of soil-borne *Rhizoctonia solani* AG-2-2-IIIB resistance in sugar beet. *Biology*, 11(49), 1-17.
- Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York. 2000.
- Schneider, C.L., Ruppel, E.G., Hecker, R.J., & Hogaboam, G.J. (1982). Effect of soil deposition in crowns on development of *Rhizoctonia* root rot in sugar beet. *Plant Disease*, 66, 408-410.
- Sen, A., & Alikamanoglu, S. (2012). Analysis of drought-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mutants induced with gamma radiation using SDS-PAGE and ISSR markers. *Mutation Research*, 738, 38-44.
- Sharma, M.D., Dobhal, U., Singh, P., Kumar, S., Gaur, A.K., Singh, S.P., Jeena, A.S., Koshy, E.P., & Kumar, S. (2014). Assessment of genetic diversity among sugarcane cultivars using novel microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 13, 1444-1451.
- Soltani Nezhad, S., Mahmoodi, S.B., & Farrokhi Nezhad, R. (2008). Characterization of sugar beet *Rhizoctonia* isolates in Iran. *Journal of Sugar Beet*, 23(2), 135-150. (In Persian).
- Srivastava, S., Gupta, P.S., Saxena, V.K., & Srivastava, H.M. (2007). Genetic diversity analysis in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) using isozymes, RAPD and ISSR markers. *Cytologia*, 72, 265-274.
- Srivastava, S., Pathak, A.D., Kumar, R., & Joshi, B.B. (2017). Genetic diversity of sugar beet genotypes evaluated by microsatellite DNA markers. *Journal of Environmental Biology*, 38(5), 777-783.
- Stump, W.L., Franc, G.D., Harveson, R.M., & Wilson, R.G. (2004). Strobilurin fungicide timing for *Rhizoctonia* root and crown rot suppression in sugar beet. *Journal of Sugar Beet Research*, 41, 17-37.
- Vilgalys, R., & Cubeta, M.A. (1994). Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 135-155.
- Windels, C.E., Jacobsen, B.J., & Harveson, R.M. (2009). *Rhizoctonia* root and crown rot. In RM Harveson, LE Hanson, GL Hein (Eds.), *ompendium of beet diseases and pests. American Phytopathological Society*, 33-36.
- Wounde, K.V.D. (2015). *Rhizoctonia* root rot. *Technical Leaflet. SESVanderhave*. 24.